

# 不同 pH 和盐度下海洋细菌对赤潮藻生长和产毒的影响<sup>\*</sup>

苏建强<sup>1</sup> 郑天凌<sup>1\*</sup> 胡 忠<sup>1</sup> 徐金森<sup>1</sup> 俞志明<sup>2</sup> 宋秀贤<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005; <sup>2</sup> 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**【摘要】** 研究了在可控生态条件下, 一株分离自厦门西海域沉积物的海洋细菌 *S*<sub>10</sub> 在不同 pH 和盐度条件下对赤潮原因种塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 生长和产毒的影响。结果表明, 实验用藻株适宜生长 pH 为 6 ~ 8, 适宜盐度为 20 ~ 34; 该藻株在不同 pH 及不同盐度条件下, 藻细胞毒力差异显著, 且随着 pH 升高而下降, 随着盐度增加而加大, 到盐度为 30 时达到最高值, 然后逐渐下降; 菌株 *S*<sub>10</sub> ( $1.02 \times 10^{10}$  cells · ml<sup>-1</sup>) 在 pH 7 ~ 9 和盐度 15 ~ 34 下均能有效抑藻生长和产毒, 且在 pH 7、盐度 34 时其抑藻生长作用最强; 在 pH 7 时抑藻产毒效果较好, 且其抑藻产毒作用强度不随盐度变化而异。

**关键词** 海洋细菌 塔玛亚历山大藻 麻痹性贝毒

**文章编号** 1001 - 9332(2003)07 - 1161 - 04 **中图分类号** Q143 **文献标识码** A

**Effects of marine bacteria on the growth and toxin production of red tide algae under different pH and salinities.** SU Jianqiang<sup>1</sup>, ZHENG Tianling<sup>1</sup>, HU Zhong<sup>1</sup>, XU Jingsen<sup>1</sup>, YU Zhiming<sup>2</sup>, SONG Xiuxian<sup>2</sup> (<sup>1</sup> School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; <sup>2</sup> Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China). - Chin. J. Appl. Ecol., 2003, 14(7): 1161 ~ 1164.

The effects of strain *S*<sub>10</sub> isolated from sediments of Xiamen Western Sea Area on the growth and paralytic shellfish poison (PSP) production of *Alexandrium tamarense* at different pH and salinities were studied. The results showed that the alga grew well at pH 6 ~ 8 and at salinity of 20 ~ 34. The toxicity of *A. tamarense* varied markedly at different pH and salinities: it decreased with increasing pH, while increased with salinity and reached its peak value at the salinity of 30, and then declined. The strain *S*<sub>10</sub> inhibited the growth and the PSP production of *A. tamarense* at different pH and salinities. It had the best inhibitory function on the growth of *A. tamarense* at pH 7 and salinity of 34. The best inhibitory function on the PSP production of *A. tamarense* was at pH 7, but this inhibitory function was not related to salinity.

**Key words** Marine bacteria, *Alexandrium tamarense*, Paralytic shellfish poison

## 1 引言

20 世纪以来, 随着沿海地区人口激增, 工农业的迅速发展, 有害赤潮频繁发生, 已经成为当今全球性的海洋灾害。塔玛亚历山大藻是一种重要的有毒藻, 其产生的麻痹性贝毒 (paralytic shellfish poison) 往往经由贝类、鱼类等媒介造成人类中毒。近年来, 塔玛亚历山大藻在我国近岸水体和底泥中时有出现<sup>[10, 13]</sup>。赤潮藻类的生长和增殖与海洋细菌的作用密切相关, 某些细菌可通过直接或间接的作用抑制藻细胞的生长, 甚至裂解藻细胞, 从而表现为杀藻效应, 这就为微生物防治赤潮提供了可能途径<sup>[11]</sup>。关于海洋细菌对赤潮藻生长和产毒有何影响, 多见于国外文献, Doucette 等<sup>[3, 4]</sup>曾对藻菌关系作过相关综述, 近年来众学者更致力于从群落水平研究细菌同赤潮藻之间的相互关系<sup>[7, 15, 16]</sup>。国内在藻菌关系研究方面显得相对薄弱, 只有少数几篇介绍性文

章<sup>[11, 12, 14, 20, 21]</sup>, 尤其是细菌对藻类产毒的影响更是少见报道, 而研究表明细菌确实能影响毒素产量<sup>[1, 4, 6, 12]</sup>, 因此本文在可控生态条件下研究了一株海洋细菌在不同 pH 和盐度条件下对塔玛亚历山大藻生长、产毒的影响, 以填补这一方面的空白。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

**2.1.1 藻种来源与培养条件** 实验用单细胞藻类塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*), 由暨南大学水生生物研究所提供。培养液为 f/2 的改良配方, 培养温度为 20 ℃, 光周期 L:D = 12h:12h。

**2.2.1 菌种** 实验用的菌种 *S*<sub>10</sub> 分离自厦门西海域底泥, 为本实验室保存的菌种。

<sup>\*</sup> 国家重点基础研究发展规划项目 (2001CB409710) 和国家自然科学基金资助项目 (49676302, 30200041)。

<sup>\*\*</sup> 通讯联系人, wshwzh@jingxian.xmu.edu.cn

2002 - 12 - 18 收稿, 2003 - 03 - 03 接受。

2.2 方法

2.2.1 菌悬液的制备 用无菌海水将斜面上的细菌洗出,注入加有玻璃珠的无菌三角瓶中,振荡,使菌细胞分散,用平板计数法测定起始细菌数,用无菌海水稀释为  $7.63 \times 10^{12}$  cells · ml<sup>-1</sup> 的菌悬液.

2.2.2 pH、盐度的设定 pH 设定:用 0.1 mol L<sup>-1</sup> 的 NaOH 和 0.1 mol L<sup>-1</sup> 的 HCL 调节 f/2 培养液的 pH 为 6.0、7.0、8.0、9.0. 盐度设定:实验用的为放置半年的陈海水,盐度测定为 34,用此海水和不同量的蒸馏水及 f/2 母液配制成盐度分别为 15、20、25、30、34 的培养液.

2.2.3 菌藻混合培养 1) 实验组:730ml f/2 培养液 + 10ml 菌悬液 + 10ml 藻培养液;2) 对照组(A):740ml f/2 培养液 + 10ml 藻培养液.

2.2.4 取样 隔天取样测定藻细胞密度,于第 16 天收获藻细胞测定毒素含量.

2.2.5 藻细胞密度测定 采用鲁哥氏液固定后显微镜计数法.

2.2.6 藻毒素提取与藻毒力测定 毒素提取参照江天久的方法<sup>[9]</sup>,取塔玛亚历山大藻培养液 400 ml 以 2500 ×g 离心 10min,去掉上清液,加入约 3~4 ml 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCL 并以 1 mol L<sup>-1</sup> 的 NaOH 调整其 pH 为 3~4,在冰水浴中超声波破碎 5~15 min 后镜检,当细胞全部破碎后,置于沸水中水浴 5 min,冷却到室温,用 0.1 mol L<sup>-1</sup> 的 HCL 和 NaOH 调整其 pH=3,以蒸馏水定容到 5 ml,3500 ×g 离心 10 min,取上清液做藻毒性实验用.

以美国 AOAC(Association of Official Analytical Chemists)推荐的小白鼠生物检测法进行藻毒性实验并计算其藻毒性<sup>[2]</sup>.该法是向小白鼠腹腔注射 1 ml 适当稀释的藻毒提取液,使小鼠死亡时间落在 5~7 min 内.观察其死亡症状,按照 Sommer's table 换算毒力大小.再依据提取液体积和总细胞数,

表 1 不同 pH 下菌株 S<sub>10</sub>对塔玛亚历山大藻生长(细胞密度 cells · ml<sup>-1</sup>)的影响

pH		天数 Days									
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
对照 CK	6	180	270	350	930	1320	1700	3300	4700	7950	11450
	7	180	290	460	920	1670	2860	4050	6950	10500	15500
	8	180	200	350	700	1320	2120	3900	6000	8400	10400
	9	180	290	280	460	530	1360	1900	3550	5550	8100
实验 Exp.	6	180	290	910	1430	2600	4840	6200	8500	11350	16100
	7	180	210	350	620	960	1630	3200	4050	5850	7700
	8	180	250	200	540	960	1630	2850	3650	4850	6600
	9	180	220	220	330	800	1250	2650	3350	4050	5400

从表 2 可以看出,不同 pH 值条件下,对照组培养第 16 天的塔玛亚历山大藻细胞毒力差异显著,pH 6、7 条件下毒性较强,pH 8、9 条件下毒性较弱,基本上藻毒力随着 pH 升高而降低,这可能是由于麻痹性贝毒的某些成分在碱性条件下分解所致<sup>[8,17]</sup>.除 pH 9 实验组由于藻细胞密度过小未能检出 PSP 毒性外,从实验结果来看,我们发现在各 pH 条件下 S<sub>10</sub>均能有效抑藻产毒,在 pH 6、7、8 下实

换算为单位细胞的毒性,用鼠单位/细胞(MU · cell<sup>-1</sup>)表示,1 个鼠单位(MU)表示使 1 只 20 g 小白鼠在 15 min 死亡的毒素量.所用动物为 20 g 左右的昆明种雄性小白鼠(厦门大学抗癌研究中心实验动物室提供).

3 结果与分析

3.1 不同 pH 下菌株 S<sub>10</sub>对塔玛亚历山大藻生长和产毒的影响

从表 1 可以看出,在水体温度、盐度条件适宜时,塔玛亚历山大藻在 pH 6~9 范围内都可较好生长,其中在 pH7 时生长状况最好,在 pH 9 时最差,表明该藻株可以在弱酸至弱碱环境下很好生长,这同江天久利用本藻株实验结果相似<sup>[9]</sup>,他们实验得出该藻株在 pH 6~8 时生长较好,pH 高于 9 时,其生长受到抑制,而本实验表明该藻在 pH 9 时仍生长较好,这可能是由于藻种经过多代培养其适应性有所改变所致.

在加入 S<sub>10</sub>的培养液中,塔玛亚历山大藻的生长状况随着 pH 升高而下降,其中在 pH 6 时,藻细胞生长较好,在 pH 7、8、9 时藻细胞生长状态基本接近.结合对照来看,当 pH 6 时,在培养液内加入 S<sub>10</sub>有较明显的促进藻类生长的作用,而在 pH 7、8、9 时,S<sub>10</sub>都有不同程度的抑制藻类生长的作用,其中以 pH 7 时抑制效果最好,在 pH 9 时,虽然藻类有最低的生长速率和细胞密度,但此时对照也具有较低的生长速率和细胞密度,因此 pH 9 本身就是藻类生长的限制因素,S<sub>10</sub>的作用并不明显.

验组藻毒力分别相当于对照的 53.80 %、43.39 %、

表 2 不同 pH 下菌株 S<sub>10</sub>对塔玛亚历山大藻毒力(10<sup>-6</sup> MU · cell<sup>-1</sup>)的影响

Table 2 Effect of the strain S<sub>10</sub> on the toxicity of A. tamarensis at different pH

项目 Item	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
对照 CK	11.32 ±0.49	10.37 ±0.59	7.45 ±0.32	5.81 ±0.08
实验 Exp.	6.09 ±0.22 **	4.50 ±0.14 **	5.48 ±0.12 **	未检出 (ND)
E/C (%)	53.80	43.39	73.56	

\* P<0.05, \*\* P<0.01, ND:No detected. 下同 The same below.

73.56%,其中以 pH 7 条件下作用较明显。

3.2 不同盐度下菌株 S<sub>10</sub>对塔玛亚历山大藻生长和产毒影响

塔玛亚历山大藻对盐度有较广的适应性(表 3),在盐度 15 ~ 34 范围内,该藻均可生长,在盐度为 20 时生长最佳,盐度为 15 时该藻生长速率明显较低,本实验结果同江天久<sup>[9]</sup>利用本藻株实验结果基本相似。在加入 S<sub>10</sub>的培养液中,盐度为 20 时藻细胞在整个周期生长最好,盐度为 15 时藻细胞生长最差;同对照相比,盐度为 15 时实验和对照藻细胞生长状况相似,表明此时盐度对藻类生长的抑制作用占主导地位,S<sub>10</sub>的作用不明显;在盐度为 20、25、30、34 时,S<sub>10</sub>都表现出不同程度的抑制作用,其中在盐度为 34 时抑制作用较强。

不同盐度条件下,在培养第 16 天的塔玛亚历山

表 3 不同盐度下菌株 S<sub>10</sub>对塔玛亚历山大藻生长(细胞密度 cells·ml<sup>-1</sup>)的影响  
Table 3 Effect of the strain S<sub>10</sub> on the growth of A. tamarensis at different salinities

	pH	天数 Days									
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
对照 CK	15	180	170	230	300	420	810	950	2200	3500	5500
	20	180	360	460	1050	1790	2930	5750	7100	12300	17800
	25	180	290	350	850	1570	2260	5300	6200	8900	11300
	30	180	240	360	750	1660	2890	4400	6950	8400	10700
	34	180	190	350	790	1250	2110	3900	6850	8550	12100
实验 Exp.	15	180	230	310	440	790	1310	1750	2200	3450	4900
	20	180	370	410	900	1660	3010	4850	6050	10100	13100
	25	180	250	460	820	1480	2670	3900	5300	7250	7800
	30	180	290	370	630	940	1370	2550	4050	4850	6500
	34	180	230	440	610	960	1360	2350	3700	4650	6300

表 4 不同盐度下菌株 S<sub>10</sub>对塔玛亚历山大藻毒力(10<sup>-6</sup> MU·cell<sup>-1</sup>)的影响  
Table 4 Effect of the strain S<sub>10</sub> on the toxicity of A. tamarensis at different salinities

	盐度 Salinity				
	15	20	5	30	34
对照 CK	未检出	5.42 ±0.30	6.54 ±0.20	9.08 ±0.23	7.69 ±0.33
实验 Exp.	ND	3.51 ±0.08 *	4.37 ±0.14 *	6.03 ±0.29 *	5.36 ±0.16 **
E/C (%)		64.76	66.82	66.41	69.70

验均由于藻细胞密度过低,未能检出 PSP 毒性;从其它各组实验结果来看,在盐度 20、25、30 下,实验组和对照组藻毒力都随着盐度升高而增加,在 30 时达到最高,然后在盐度 34 时下降。同对照相比,各实验组藻毒力均有明显下降,分别相当于对照的 64.76%、66.82%、66.41%、69.70%,其下降幅度相近。因此,可以认为,不同盐度下在培养液中加入 S<sub>10</sub>均能抑制塔玛亚历山大藻产毒,但其抑制作用的强度不随盐度变化而变化。

4 结 语

本文研究了一株海洋细菌 S<sub>10</sub>在不同 pH 和盐

度条件下对塔玛亚历山大藻生长、产毒的影响。结果表明,菌株 S<sub>10</sub>在一定 pH、盐度下能对藻类生长和产毒产生明显抑制作用。近年来,危害日益严重的有毒赤潮已引起了各沿海国家的关注,我国是一个海产经济大国,有害赤潮已造成巨大经济损失。因此,如何有效防治有害赤潮已经成为各国当务之急的环保措施。目前赤潮的防治,主要是采取化学方法。化学方法防治虽可迅速有效地控制赤潮,但所施用的化学药剂给海洋带来了新的污染。因此,越来越多的人将目光投向了生物防治技术。

海洋微生物由于其本身的种群多样性、生理生化类群多样性、生态功能多样性、遗传特征多样性等特点以及同赤潮藻类错综复杂的生态关系,因而在赤潮生消过程中有着极其重要的作用。利用微生物如细菌的抑藻作用,使海洋环境保持长期的可靠的生态平衡,从而达到防治赤潮的目的,就可以避免化学法治理赤潮带来新污染的缺陷,这也是赤潮微生物防治独特的优越性,因此,“以菌治藻”作为一种新思路在赤潮治理中具有巨大的作用与广阔的应用前

景. 本文研究结果将为赤潮的生物防治提供科学的理论依据和实践基础.

## 参考文献

- Bates SS, Douglas DJ, Doucette GJ, Leger C. 1995. Enhancement of domoic acid production by reintroducing bacteria to axenic cultures of the diatom *Pseudonitzschia multiseries*. *Nat Toxins*, 3:428~435
- Cembella AD, Milenkovic L, Doucette G, et al. 1995. *In vitro* biochemical methods and mammalian bioassays for Phycotoxins. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD, eds. Manual on Harmful Marine Microalgae, Intergovernmental Oceanographic Commission Manuals and Guides No. 33. UNESCO:177~223
- Doucette GJ. 1995. Assessment of the interaction of prokaryotic cells with harmful algal species. In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C eds. Harmful Marine Algal Blooms. Paris:Lavoisier Science Publ. 385~394
- Docucette GJ, Kodama M, Gallacher S. 1998. Bacterial interaction with harmful algal bloom species: Bloom ecology, toxigenesis and cytology. In: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM eds. Physiological Ecology of Harmful Algal Bloom. NATO ASI Series, Vol. G41. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 619~647
- Flynn KJ, Flynn K, John EH, et al. 1996. Changes in toxins, intracellular and dissolved free amino acids of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in response to changes in inorganic nutrients and salinity. *J Plank Res*, 18:2093~2111
- Hold GL, Smith EA, Birkbeck TH, Gallacher S. 2001. Comparison of paralytic shellfish toxin (PST) production by the dinoflagellates *Alexandrium lusitanicum* NEPCC 253 and *Alexandrium tamarense* NEPCC 407 in the presence and absence of bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*, 36:223~234
- Hold GL, Smith EA, Rappe MS, et al. 2001. Characterization of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. *FEMS Microbiol Ecol*, 37:161~173
- Indrasena WM, Gill TA. 2000. Storage stability of paralytic shellfish poisoning toxins. *Food Chem*, 71:71~77
- Jiang T-J (江天久), Huang W-J (黄伟建), Wang C-H (王朝晖), et al. 2000. Effects of water temperature, salinity and pH on growth and toxicity of *Alexandrium tamarense* (Lebour) balech (Dapeng strain). *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 6(2):151~154 (in Chinese)
- Li R-X (李瑞香), Xia B (夏滨). 1996. Two toxic dinoflagellates in Jiaozhou Bay—*Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella*. In: Zhu M-Y (朱明远), Li R-X (李瑞香), Wang F (王飞), eds. Red-tide Research of China. Qingdao: Qingdao Press. 36~41 (in Chinese)
- Lian Y-W (连玉武), Wang Y-L (王艳丽), Zheng T-L (郑天凌), et al. 1999. Advance in the research on interaction between red-tide algae and bacteria. *Mar Sci* (海洋科学), 1:35~39 (in Chinese)
- Lin W (林伟), Zhou M-J (周名江). 2001. Effect of marine bacteria on harmful algal bloom. *Mar Sci* (海洋科学), 25(3):34~38 (in Chinese)
- Lin Y-S (林元烧), Cao W-Q (曹文清), Sameer T, et al. 2002. Studies on dinoflagellate cysts and their distribution in Xiamen Western Harbour. *Oceanol Limnol Sin* (海洋与湖沼), 33(4):407~414 (in Chinese)
- Luo Y-P (罗岳平), Li Y-J (李益健), Tang Z-Q (谭智群). 1996. Adhesion behaviour of bacterial and algae and its ecological significance. *Chin J Ecol* (生态学杂志), 15(5):55~61 (in Chinese)
- Mayali X, Docucette GJ. 2002. Microbial community interactions and population dynamics of an algicidal bacterium active against *Karenia brevis*. *Harmful Algae*, 1:277~293
- Riemann L, Steward GF, Azam F. 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a Mesocom Diatom bloom. *Appl Environ Microbiol*, 66(2):578~587
- Ravn H, Anthoni U, Christophersen C, et al. 1995. Standardized extraction method for paralytic shellfish toxins in phytoplankton. *J Appl Phycol*, 7:589~594
- Usup G, Kulis DM, Anderson DM. 1994. Growth and toxin production of the toxic dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in laboratory cultures. *Nat Tox*, 2:254~262
- White AW. 1978. Salinity effects on growth and toxin content of *Gonyaulax excavata*. A marine dinoflagellate causing paralytic shellfish poisoning. *J Phycol*, 14:475~479
- Wu G (吴刚), Xi Y (席宇), Zhao Y-J (赵以军). 2002. The latest development of research on algae-lysing bacteria. *Res Environ Sci* (环境科学研究), 15(5):43~46 (in Chinese)
- Zhao Y-J (赵以军), Liu Y-D (刘永定). 1996. Possible microbial control on the adverse impacts of algae—Current information about the relationship between algae and microbes. *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 20(2):174~181 (in Chinese)

作者简介 苏建强,男,1979年生,在读博士生,主要从事海洋环境微生物学研究,发表论文7篇. E-mail:ironicsjq@sina.com